

PUBLICATION OF LAID-OPEN PATENT APPLICATION

(11) Publication number : 04-283519

(43) Date of publication of application : 08.10.1992

(51) Int.Cl. A61K 39/40
A61K 35/20

(21) Application number : 03-125654

(22) Date of filing : 12.03.1991

(71) Applicant : EISAI CO., LTD.
TAKEDA SHOKUHN KOGYO K.K.
SNOW BRAND MILK PROD CO., LTD.
YAKULT HONSHA CO., LTD.

(72) Inventor : ISHIDA ATSUSATO
MUROZAKI SHINJI

(54) Title: COMPOSITION FOR SUPPRESSING REDUCTION IN
IMMUNOLOGICAL FUNCTION WITH AGING

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a composition for suppressing reduction immunological function, comprising milk squeezed from cow's milk sensitized with a bacterial antigen as an active ingredient.

CONSTITUTION: A composition for suppressing reduction immunological function, comprising milk squeezed from cow's milk sensitized with one or more bacterial antigens derived from bacteria, preferably selected from the group of bacteria shown by the table, as an active ingredient. The composition is administered in the form of powdered milk, liquid

(2)

milk, yogurt or tablet.

[Claims]**[Claim 1]**

A composition for inhibiting the lowering of immune system comprising, as an effective component, milk milked from a cow sensitized by bacterial antigen.

[Claim 2]

The composition according to claim 1 wherein the bacterial antigen is derived from disease causing bacteria.

[Claim 3]

The composition according to either of claim 1 or 2 wherein the bacterial antigen is one or more species selected from a group of microorganisms shown below in Table 1.

[Table 1]

<u>Names of Bacteria</u>	<u>ATCC Number</u>
Staphylococcus Simulans	11631
Staphylococcus Epidermidis	155
Staphylococcus Pyogenes Type 1	8671
Staphylococcus Pyogenes Type 3	10389
Staphylococcus Pyogenes Type 5	12347
Staphylococcus Pyogenes Type 8	12349
Staphylococcus Pyogenes Type 12	11434
Staphylococcus Pyogenes Type 14	12972
Staphylococcus Pyogenes Type 18	12357
Staphylococcus Pyogenes Type 22	10403
Aerobacter Aerogenesis	884
Escherichia Coli	26
Salmonella Enteritidis	13076
Pseudomonas Erginoza	7700
Crepuscular Pneumoniae	9590
Salmonella Typhimurium	13311

Haemophilus Influenzae	9333
Streptococcus Mitis	6249
Proteus Vulgaris	13315
Sygera Dysenteria	11835
Propionibacterium Acnes	11827
Streptococcus Sanguis	10556
Streptococcus Salivarius	13419
Streptococcus Mutans	25175
Streptococcus Agalactiae	13813
Streptococcus Pneumoniae	6303

[Field of the Invention]

[0001]

[Industrial Field of Application]

This invention relates to a composition for inhibiting the lowering of immune system. Generally, the lowering of immune system as one form of age-related phenomena causes so-called "senescence illness", where a person tends to get sick, and thus, requiring its prevention or cure. Thus, this invention relates to a composition for oral administration for inhibiting immune system to become lowered with age.

[0002]

[Description of the Prior Art]

It is said that, in humans and animals for experiments, the amount of lymphatic tissues of thymus decreases with age due to atrophy of the cortex of thymus, for example, and the production of T cell and the redistribution of lymph cells into T cell territory of lymph nodes are hindered.

[0003]

As the result, the illness called "senescence illness" becomes more prone to occur as age progresses.

[0004]

Methods for inhibiting the lowering of immune system with age and for recovering the immune system of the aged individual may be found, for example, in the control of nutrition condition, administration of thymic hormones or chemical substance, and cell transplants. For example, it is reported that administration of giving calorie restricted diet to rats prolongs their life expectancies. Also, thymosin and thymopoietin are examples in the administration of thymic hormones.

[0005]

There are, for example, double stranded polynucleotide and sulfhydryl compound as immune activation agents. Also, the method of transplanting young lymph cells or lymphatic tissues to the aged individual has been tried.

[0006]

[Problem to be Solved by the Invention]

The method of administering calorie restricted diet to rats is not applicable to humans, because restricted diet for humans during growth period inhibits the development of immune mechanism. Thymic hormone, by itself, does not have a function for causing mature T cells to be derived from stem cell of bone marrow and neither can completely replace thymic function. Also, oral administration cannot be used due to problems of side-effects. Immune activation agents are still at the stage of research. The current stage is such that, even the method of transplanting young lymph cells or lymphatic tissues to the aged individual cannot be easily performed.

[0007]

Thus, one of the objects of the present invention is to provide a composition for inhibiting the lowering of immune system which prevents or cures the disease where illness tends to be caused by the lowering of immune system with age.

[0008]

[Method for Solving the Problem]

This invention provides for a composition for inhibiting the lowering of immune system with age comprising, as an effective component, milk milked from a cow sensitized by

bacterial antigen. The antigen used in the invention can be either pathogenic or nonpathogenic as long as it is derived from bacteria.

[0009]

The inventor et al. caused a cow to be sensitized by one or more species of antigen of bacterial origin selected from the group of microorganisms shown below in Table 2 (hereinafter referred to as "S-100 antigen" for simplicity), followed by obtaining milk from the cow subjected to several booster administration of the antigen to administer the milk to mouse (the milk is herein after referred to as "immune milk").

[0010]

[Table 2]

<u>Names of Bacteria</u>	<u>ATCC Number</u>
Staphylococcus Simulans	11631
Staphylococcus Epidermidis	155
Staphylococcus Pyogenes Type 1	8671
Staphylococcus Pyogenes Type 3	10389
Staphylococcus Pyogenes Type 5	12347
Staphylococcus Pyogenes Type 8	12349
Staphylococcus Pyogenes Type 12	11434
Staphylococcus Pyogenes Type 14	12972
Staphylococcus Pyogenes Type 18	12357
Staphylococcus Pyogenes Type 22	10403
Aerobacter Aerogenesis	884
Escherichia Coli	26
Salmonella Enteritidis	13076
Pseudomonas Erginoza	7700
Crepscular Pneumoniae	9590
Salmonella Typhimurium	13311
Haemophilus Influenzae	9333
Streptococcus Mitis	6249
Proteus Vulgaris	13315

Sygera Dysenteria	11835
Propionibacterium Acnes	11827
Streptococcus Sanguis	10556
Streptococcus Salivarius	13419
Streptococcus Mutans	25175
Streptococcus Agalactiae	13813
Streptococcus Pneumoniae	6303

Also, the milk, which has been milked from a cow subjected to booster administration of the antigen, as disclosed in JP54-113425 and JP57-1188523, shows similar effects. As milk of such case, milk from a cow, which has been administered with bacteria vaccine and sensitized, and later with sufficient antigen that is identical to the bacteria for sensitization, is preferable.

[0011]

Meanwhile, in order to compare with the "immune milk", milk, which is available on the market, (hereinafter referred to as "control milk" for simplicity), was administered to mouse.

[0012]

Next, the following immunological index was measured and its change over time was observed.

[0013]

Mixed lymphocyte culture response of spleen.

[0014]

Mixed lymph node culture response of mesenteric lymph nodes.

[0015]

Mitogen response of mesenteric lymph nodes.

[0016]

As the result of these measurements, it was observed that the activity of immune milk

showed increase in each index over that of control milk. Based on this knowledge, the inventor et al. discovered that administration of immune milk can prevent or cure the age-related illness.

[0017]

[Function]

Based on the above new facts, the inventor et al. completed the present invention by discovering the composition for inhibiting the lowering of immune system with age, which comprises, as an effective component, immune milk.

[0018]

The composition of the present invention for inhibiting the lowering of immune system with age can be administered in the form of powder, liquid, yogurt, or tablets.

[0019]

[Embodiment]

Next, referring to the embodiment, the present invention will be explained in more detail. However, the invention is not to be limited to this experiment.

[0020]

Embodiment 1

[0021]

We immunized 10 cows by polyvalent vaccine made by antigen containing all of the antigens of bacterial origin listed in the Table 2 above.

[0022]

The immunization used in this case was to sensitize, by applying, for 4 consecutive weeks at the rate of each dosage of 5ml per week, the booster administration of 5ml of vaccine containing 4×10^8 / ml of each of antigen, sterilized by heating, to call it as the primary immunization. The antibody value of the said antigen of each cow was confirmed by condensation method.

[0023]

Next, the booster administration of said amount of the antigen was performed several times.

[0024]

The immune milk was obtained from immunized cows every day.

[0025]

The immune milk was later processed, according to circumstances, to obtain powder milk, for example, by skimming the fat followed by sterilization and spray-dry under temperature control.

[0026]

[Example]

[0027]

An example is shown below. The used milk is as follows:

[0028]

Immune milk: Immune milk obtained in Embodiment 1 (powder milk).

[0029]

Control milk: Milk available on the market (powder milk).

[0030]

Experiment 1: Mixed lymphocyte culture response of spleen.

[0031]

Method: 14 eight-week-old C57BL/6CrSLC female mice were divided into two groups, and administered by 48.9g of powder of immune milk or control milk into 11.1g of mixed feed, and each mouse was fed with 3g / per each day for 61~63 consecutive weeks. Afterwards, the mice were slaughtered and the spleen was extracted to be placed in a laboratory dish containing 10 cc of RPMI 1640, the spleen being squashed between two glass slides and the isolated cells being washed.

[0032]

Meanwhile, C3H or BALB/C mice that are allogeneic were also slaughtered, and 25Gy of radiation was applied to the extracted spleen, to use the obtained spleen cells as incentive cells. By using the spleen cells of the above-mentioned mice aged between 69 and 71 weeks (hereinafter called "aged mice"), for each 5×10^5 / well, 5×10^5 / well of spleen cells of C3H or BALB/C mice were added and were incubated for 4 days at 37°C in the CO₂ incubator. At 4 hours before the end of incubation, 3 H thymidine of 1 μ Ci (37MBq) well was added, and after the end of incubation, the cells were collected on a filter-mat, and the amount of thymidine labeled with tritium taken up by cells, was measured at β counter to calculate the relative stimulus index (Specific S1) of mixed lymphocyte culture response of aged mice.

[0033]

Then, the mixed lymphocyte culture response of 7 to 9-week-old C57BL/6CrSL female mice (hereinafter called "young mice") which are individuals different from the above-mentioned aged mice was measured by a method similar to the above method to calculate the relative stimulus index, and the change in the relative stimulus index of the aged mice which were fed with immune milk or control milk was compared with the standard of the relative stimulus index of young mice. Table 3 shows the results.

[0034]

[Table 3]

Age by Weeks	Label	Milk	Relative Stimulus Index \pm S.D.
7-9 (Young Mice) [C57BL/6 CrSLC Female Mice]	C3H	-	10.6 \pm 3.5
	BALB / C	-	14.7 \pm 4.0
69-71 (Aged Mice) [C57BL/6 CrSLC Female Mice]	C3H	Immune Milk	6.2 \pm 3.6
		Control Milk	3.4 \pm 2.6
	BALB / C	Immune Milk	8.5 \pm 4.3

		Control Milk	4.5 ± 2.8
--	--	--------------	---------------

[0035]

Next, for each case where C3H and BALB / C each is used as a label, the value (C) obtained by subtracting the value of the relative stimulus index for the aged mice (B) from the value of relative stimulus index of the young mice (A) was compared for each group where the immune milk or the control milk was administered to examine to what degree the group where the immune milk was administered inhibited the lowering of the mixed lymphocyte culture response of spleen with age. Table 4 shows the results.

[0036]

[Table 4]

Label	Milk	A-B=C	t-Test
C3H	Immune Milk	4.4 ± 3.6	$P < 0.1$
	Control Milk	7.2 ± 2.6	
BALB / C	Immune Milk	6.2 ± 4.3	$P < 0.05$
	Control Milk	10.2 ± 2.8	

[0037]

Upon review of the results, it was confirmed that the group where immune milk was administered showed a substantial inhibition of the lowering of the mixed lymphocyte culture response of spleen with age, compared to the group where control milk was administered.

[0038]

The mixed lymphocyte culture response above was performed based on pages 383-385 of "Jikken-Seiri-Gaku-Koza", Volume 14 of IMMUNOBIOLOGY, co-authored by Shigeru Muramatsu.

[0039]

The relative stimulus index is represented by the mathematical formula I as shown below.

[0040]

[Mathematical Formula I]

$$\text{Relative Stimulus Index} = \frac{\text{cpm of effector cells} \\ \text{to which stimulus cells are added}}{\text{cpm of effector cells only}}$$

[0041]

Experiment 2: The mixed lymphocyte culture response of mesentery.

[0042]

Method: 14 eight-week-old C57BL/6CrSLC female mice were divided into two groups, and administered by 48.9g of powdered immune milk mixed into 11.1g of mixed meal to be fed to each group (7 mice) at the rate of 3g per mouse every day for 69 – 71 consecutive weeks.

These mice were then slaughtered and opened along their abdomens to have mesenteric lymph nodes extracted and the nodes were placed in the laboratory dish containing 10-cc of culture media RPMI 1640, and were squashed in the laboratory dish between two glass slides. The isolated cells were then filtered by gauze to be collected, and lymph cells of mesenteric lymph nodes were obtained.

[0043]

Meanwhile, C3H or BALB/C mice that are allogeneic were slaughtered and the spleen cells which were obtained after applying 25Gy of radiation to the extracted spleen was used as incentive cells. By using the lymph cells included in the mesenteric lymph nodes of the above-mentioned aged mice, and to each 5×10^5 / well, spleen cells of 5×10^5 / well of C3H or BALB/C mice were added, to be incubated for 3 days in the CO₂ incubator at 37°C.

At 4 hours before the end of incubation, 3 H thymidine of 1 μ Ci (37MBq) well was added, and after the completion of incubation, and the amount of thymidine, labeled with tritium taken up by the cells collected on filter-mats, was measured by using β counter, and the relative stimulus index of mixed lymphocyte culture response of aged mice was calculated.

[0040]

Then, the mixed lymphocyte culture response of young mice, which are individuals each different from the above-mentioned aged mice, was measured by a method similar to the above method, and the relative stimulus index was calculated, and further, the movement of the relative stimulus index of the aged mice fed with immune milk or control milk was compared with the relative stimulus index of the young mice. Table 5 shows the results.

[0045]

[Table 5]

Age by Weeks	Label	Milk	Relative Stimulus Index \pm S.D.
7-9 (Young Mice) [C57BL/6 CrSLC Female Mice]	C3H	-	19.96 \pm 6.84
	BALB / C	-	24.76 \pm 3.56
69-71 (Aged Mice) [C57BL/6 CrSLC Female Mice]	C3H	Immune Milk	9.92 \pm 6.25
		Control Milk	3.66 \pm 3.43
	BALB / C	Immune Milk	14.89 \pm 8.64
		Control Milk	4.86 \pm 3.72

[0046]

Next, for each case where C3H and BALB / C each is used as a label, the value (F) obtained by subtracting the value of the relative stimulus index of the aged mice (E) from the value of relative stimulus index of the young mice (D) was compared for each group where the immune milk or the control milk was administered to examine to what degree the group where the immune milk was administered inhibited the lowering of mixed lymphocyte culture response of spleen. Table 6 shows the results.

[0047]

[Table 6]

Label	Milk	D-E=F	t-Test
C3H	Immune Milk	10.0 ± 6.3	-
	Control Milk	16.3 ± 3.4	
BALB / C	Immune Milk	9.9 ± 8.6	P<0.05
	Control Milk	19.9 ± 3.7	

[0048]

From the results, it was confirmed that the group where immune milk was administered showed a substantial inhibition of lowering with age of mixed lymphocyte culture response of mesenteric lymph nodes compared to the group where control milk was administered.

[0049]

Experiment 3: Mitogenic response of mesenteric lymph nodes.

[0050]

Method: 14 eight-week-old C57BL/6CrSLC female mice were divided into two groups and administered by 48.9g of powdered immune milk or control milk mixed into 11.1g of mixed feed for each group (7 mice) at the rate of 3g per mouse every day for 69 – 71 consecutive weeks. These mice were then slaughtered and opened along their abdomens to have mesenteric lymph nodes extracted, and the nodes were placed in the laboratory dish containing 10 cc of culture media RPMI 1640 and were squashed inside the laboratory dish

(16)

between two glass slides. The isolated cells were then filtered with gauze, to be collected, and lymph cells of mesenteric lymph nodes were obtained. By using the lymph cells included in the mesenteric lymph nodes of the above-mentioned aged mice, to each 5×10^5 / well, $0.4 \mu\text{g}$ / well of concanavalin A (Con A) and 0.02% (V / V) / well of phytohaemagglutinin (PHA) or $10 \mu\text{g}$ / well of lipopolysaccharide were added, and the cells were incubated for 3 days in the CO₂ incubator at 37°C. At 4 hours before the end of incubation, 3 H thymidine of 1 μCi (37MBq) well was added, and after the completion of incubation, the amount of thymidine labeled with tritium taken up by the cells collected on filter-mats was measured by using β counter, and the relative stimulus index of mixed lymphocyte culture response of aged mice was calculated.

[0051]

Then, the mitogenic response of mesenteric lymph nodes of young mice which are individuals each different from the above-mentioned aged mice was measured by a method similar to the above method, and the variance of the relative stimulus index of the aged mice fed with immune milk or control milk was compared to the relative stimulus index of the young mice. Table 7 shows the results.

[0052]

[Table 7]

Age by Weeks	Label	Milk	Relative Stimulus Index \pm S.D.
7-9 (Young Mice) [C57BL/6 CrSLC Female Mice]	Con A	-	23.8 ± 15.2
	PHA	-	14.4 ± 7.3
	LPS	-	12.4 ± 5.4
69-71 (Aged Mice) [C57BL/6 CrSLC Female Mice]	Con A	Immune Milk	13.5 ± 5.1
		Control Milk	10.2 ± 7.5
	PHA	Immune Milk	16.4 ± 4.4
		Control Milk	2.8 ± 2.1
	LPS	Immune Milk	13.8 ± 3.1
		Control Milk	3.1 ± 2.4

[0053]

Next, for each case where Con A, PHA, and LPS each is used as a label, the value (t) obtained by subtracting the value of the relative stimulus index of the aged mice (H) from the value of relative stimulus index of the young mice (G) was compared for each group where the immune milk or the control milk was administered to examine to what degree the group where the immune milk was administered inhibited the lowering of the mixed lymphocyte culture response of spleen with age. Table 8 shows the results.

[0054]

[Table 8]

Label	Milk	G-H=I	t-Test
ConA	Immune Milk	10.3 ± 5.1	-
	Control Milk	13.6 ± 7.5	
PHA	Immune Milk	-2.0 ± 4.4	P<0.05
	Control Milk	11.6 ± 2.1	
LPS	Immune Milk	-1.4 ± 3.1	P<0.05
	Control Milk	9.3 ± 2.4	

[0055]

Incidentally, Con A (concanavalin A) and PHA (phytohaemagglutinin) are plant-derived lectins. They are each a kind of mitogen which stimulates and activates T cells and cause DNA synthesis and cell proliferation.

[0056]

The lymph cells of mesenteric lymph nodes include B cells other than T cells, and the response to LPS (lipopolysaccharide) was also measured as an index of the immunocompetency of B cells.

[0057]

When the degree of lowering with age of the mitogenic response of mesenteric lymph nodes for the group where the control milk was administered was compared with that of the group where the immune milk was administered, the group where the immune milk was

administered showed a substantial inhibition of spleen with age compared to the group to which control milk was administered.

[0058]

[Effect]

The immune function undertakes the roles of protection against infection and the function of surveillance of immune mechanism within the body, and the lowered immune system with age leads to illness.

[0059]

The composition of the present invention which inhibits the lowering with age of immune system shows the effect of preventing or curing so-called senescence illnesses, such as infection of respiratory tract including pneumonia, skin disease including herpes zoster, infection of urinary tract, and infection of biliary tract, which are said to be more prone to occur with age, complications, festering sore, and symptoms of common cold, which elderly people suffer after surgical operations.

[0060]

Also, the composition of the present invention is superior in its utility where it can be readily taken every day because it can be orally administered and has high safety.

2443

【公報種別】公開特許公報

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成6年（1994）11月29日

【公開番号】特開平4-283519

【公開日】平成4年（1992）10月8日

【年通号数】公開特許公報4-2836

【出願番号】特願平3-125654

【訂正要旨】明細書誤載につき下記の通り全文を訂正する。

【国際特許分類第5版】

A61K 39/40 ABD 9284-4C

35/20 7431-4C

【記】別紙のとおり

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-283519

(43)公開日 平成6年(1994)11月29日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/40	A B D	8413-4C		
35/20		9165-4C		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 9 頁)

(21)出願番号	特願平3-125654	(71)出願人	000000217 エーザイ株式会社 東京都文京区小石川4丁目6番10号
(22)出願日	平成3年(1991)3月12日	(71)出願人	000238511 武田食品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号
		(71)出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
		(71)出願人	000006884 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号
		(74)代理人	弁理士 高木 六郎 (外1名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 加齢に伴う免疫機能低下を抑制する組成物

(57)【要約】

【目的】 加齢に伴って発症し易くなる疾患を予防または治療する組成物を提供する。

【構成】 細菌性抗原で感作した乳牛から搾乳した乳を有効成分として成る免疫機能低下抑制用組成物である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細菌性抗原で感作した乳牛から搾乳した乳を有効成分として成る免疫機能低下を抑制する組成物。

【請求項2】 細菌性抗原が病原菌由来である請求項1

の免疫機能低下を抑制する組成物。

【請求項3】 細菌性抗原が、下記の表1に示す微生物群から選択された1種若しくは2種以上である請求項1又は請求項2の免疫機能低下を抑制する組成物。

【表1】

細菌名	ATCC 番号
スタフィロコッカス シムランス	11631
スタフィロコッカス エピデルミディス	155
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 1	8671
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 3	10389
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 5	12347
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 8	12349
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 12	11434
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 14	12972
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 18	12357
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 22	10403
アエロバクター アエロゲネス	884
エシェリキア コリ	26
サルモネラ エンテリティディス	13076
シュールドモナス エルギノーザ	7700
クレブシェラ ニューモニエ	9590
サルモネラ チフィムリュウム	13311
ヘモフィルス インフルエンゼ	9333
ストレプトコッカス ミチス	6249
プロテウス ブルガリス	13315
シゲラ ディセンテリエ	11835
プロピオバクテリウム アクネス	11827
ストレプトコッカス サングイス	10556
ストレプトコッカス サリバリウス	13419
ストレプトコッカス ミュータンス	25175
ストレプトコッカス アガラクチエ	13813
ストレプトコッカス ニューモニエ	6303

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、免疫機能低下を抑制するための組成物に関する。一般的に、加齢現象の一つとして、免疫機能低下により発症し易くなる、いわゆる「老齢病」が起きるので、その予防または治療が必要となるため、本発明は、このような加齢に伴う免疫機能低下を抑制するための経口組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 ヒトや実験動物では、胸腺の皮質の萎縮などにより加齢とともに胸腺のリンパ組織量は減少し、T細胞の産生やリンパ節のT細胞領域へのリンパ球再分布が障害されているといわれている。

【0003】 そのため、加齢が進行するにつれて、いわゆる老齢病とよばれる疾患が発症し易くなる。

【0004】 加齢に伴う免疫機能の低下を抑制し、老齢個体の免疫機能を回復させる方法としては、栄養状態の調節、胸腺ホルモンおよび化学物質の投与、細胞の移植

などがある。例えばラットにカロリー制限食を与えると寿命が延びることが報告されている。また、胸腺ホルモンを投与するものとしてはサイモシン、サイモボエチンなどの例示がある。

【0005】免疫賦活剤としては、2重鎖ポリヌクレオチド、スルフヒドリル化合物などがある。また若いリンパ球あるいは組織を、老個体に移植する方法が試みられている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ラットにカロリー制限食を与えるという方法を、ヒトには応用できない何故ならば、ヒトの成長期における制限食は、免疫機能の発達を抑制してしまうからである。胸腺ホルモンは、その物質だけでは骨髄の幹細胞から成熟したT細胞を誘導するほどの能力はなく、いずれも胸腺機能を完全に代行することはできない。また副作用の問題もあるので、経口投与もできない。免疫賦活剤はまだ研究の段階に止まっている。若いリンパ球あるいは組織を、老個体に移植する方法も安易に行なうことができないのが現状である。

【0007】したがって、本発明は、加齢に伴う免疫機能の低下のために発症し易くなる疾患を予防または治療する、免疫機能低下抑制用組成物を提供することを目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、細菌性抗原で感作した乳牛から搾乳した乳を有効成分として成る加齢に伴う免疫機能低下を抑制する組成物を提供するものである。本発明において使用する抗原は微生物由来のものであれば病原性、非病原性いずれでもよい。

【0009】本発明者等は、下記の表2に示した微生物群（以下、便宜上「S-100抗原」と略称する）から選択した1種または2種以上の細菌性抗原を、雌牛に感作させた後、該抗原を数回ブースター投与することにより感作された乳牛からの搾乳（以下、便宜上「免疫乳」と略称する）について、これをマウスに投与した。

【0010】

【表2】

細菌名	ATCC 番号
スタフィロコッカス シムランス	11631
スタフィロコッカス エピデルミディス	155
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 1	8671
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 3	10389
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 5	12347
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 8	12349
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 12	11434
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 14	12972
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 18	12357
ストレプトコッカス ビオゲネス タイプ 22	10403
アエロバクター アエロゲネス	884
エシェリキア コリ	26
サルモネラ エンテリティディス	13076
シュードモナス エルギノーザ	7700
クレブシエラ ニューモニエ	9590
サルモネラ チフィムリウム	13311
ヘモフィルス インフルエンゼ	9333
ストレプトコッカス ミチス	6249
プロテウス ブルガリス	13315
シゲラ ディセンテリエ	11835
プロピオバクテリウム アクネス	11827
ストレプトコッカス サングイス	10556
ストレプトコッカス サリバリウス	13419
ストレプトコッカス ミュータンス	25175
ストレプトコッカス アガラクチエ	13813
ストレプトコッカス ニューモニエ	6303

又、特開昭54-113425号公報及び特開昭57-1188523号公報に開示された抗原をブースター投与された雌牛より搾乳した乳も同様の効果を有する。このような乳としては、雌牛に細菌ワクチンを投与して感作し、その後、感作細菌と同一の抗原を十分量投与し、これから搾乳したものが望ましい。

【0011】他方、この「免疫乳」と対比するため、通常市販の牛乳（以下、便宜上、「コントロール乳」と略称する）をマウスに投与した。

【0012】次に、前記のそれぞれのマウスについて、下記の免疫学的指標を測定し、時間の経過とともにその変化を観察した。

【0013】脾臓の混合リンパ球培養反応

【0014】腸間膜リンパ節の混合リンパ節培養反応

【0015】腸間膜リンパ節のマイトジェン応答性

【0016】これらの測定結果、免疫乳の方がコントロール乳よりも、いずれの活性も増加することを知得した。この知見に基づき、本発明者等は免疫乳を投与することにより、加齢に伴う疾患を予防または治療することを見い出した。

【0017】

【作用】上記新規事実を根拠として、本発明者等は免疫乳を有効成分とする加齢に伴う免疫機能低下を抑制する組成物を見出し、本発明を完成した。

【0018】本発明に係る加齢に伴う免疫機能低下を抑制する組成物は、粉乳、液状乳、ヨーグルトまたは錠剤などの形態で投与することができる。

【0019】

【実施例】次に、実施例を、本発明を更に具体的に説明する。ただし、本発明はこの実施例のみに限定されるものではない。

【0020】実施例1

【0021】前記表2の細菌性抗原の総てを含有する抗原によって作られた多価ワクチンによって雌牛10頭を免疫化した。

【0022】この場合、免疫方法は加熱殺菌した各菌体を 4×10^8 個/ml含むワクチンの5mlずつを週1回の割合で4週間連続ブースター投与して感作させて、1次免疫とした。そして凝集法により各乳牛の該抗原に対する抗体価を確認した。

【0023】その後、該菌体量を数回ブースター投与した。

【0024】このようにして免疫化された牛から毎日搾乳して免疫乳を得た。

【0025】この免疫乳は、場合に応じて、後に加工例えば、これを脱脂した後、温度制御下で殺菌及びスプレードライを行って粉乳とした。

【0026】

【実験例】

【0027】次に実験例を示す。使用乳は次の通りである。

【0028】免疫乳：実施例1によって得た免疫乳（粉乳）

【0029】コントロール乳：通常市販の牛乳（粉乳）

【0030】実験1：脾臓の混合リンパ球培養反応

【0031】方法：8週齢のC57BL/6CrSLC雌マウス14匹を2群に分け、その各群（7匹）に、免

疫乳、またはコントロール乳の粉末48.9gを混合飼料11.1gに混入して、1日あたり3g/匹を継続的に61～63週間摂取させた。その後で屠殺し、摘出した脾臓を10ccのRPMI 1640の入ったシャーレに加え、2枚のスライドガラスで押しつぶし、遊離した細胞を回収し、洗浄した。

【0032】他方、同種異系であるC3HあるいはBALB/Cマウスを屠殺し、摘出した脾臓に25Gyの放射線量を照射し、その後に得られた脾臓細胞を刺激細胞として使用した。前記の69～71週齢のマウス（以下「加齢マウス」と称す）の脾臓細胞を使用し、その各々 5×10^5 /ウェルにC3HあるいはBALB/Cマウスの脾臓細胞 5×10^5 /ウェルを加え、CO₂インキュベーターにて37℃で4日間培養した。培養終了4時間前に、 $1 \mu\text{Ci}$ （37MBq）ウェルの³Hチミジンを添加し、培養終了後、細胞をフィルターマット上に回収し、細胞に取り込まれたトリチウムでラベルしたチミジン量をβカウンターにて測定し、加齢マウスの脾臓の混合リンパ球培養反応の相対的刺激指数（Specific SI）を算出した。

【0033】そして、前記加齢マウスとは異った個体の7～9週齢のC57BL/6CrSLC雌マウス（以下、「若齢マウス」と称す）における混合リンパ球培養反応を前記と同様の方法で測定し、相対的刺激指数を算出し、若齢マウスの相対的刺激指数を基準として、免疫乳又はコントロール乳を与えた加齢マウスの相対的刺激指数の変動を比較した。その結果を、表3に示す。

【0034】

【表3】

週 齢	指 標	乳	相 対 的 刺 激 指 数 ± S. D.
7-9（若齢マウス） [C57BL/6 CrSLC 雌マウス]	C3H	—	10.6 ± 3.5
	BALB/C	—	14.7 ± 4.0
69-71（加齢マウス） [C57BL/6 CrSLC 雌マウス]	C3H	免 疫 乳	6.2 ± 3.6
		コントロール乳	3.4 ± 2.6
	BALB/C	免 疫 乳	8.5 ± 4.3
		コントロール乳	4.5 ± 2.8

【0035】次に、C3H、BALB/Cを指標とした場合それぞれにつき、若齢マウスの相対的刺激指数の値（A）から加齢マウスの相対的刺激指数の値（B）を差し引いた値（C）を、免疫乳、又はコントロール乳を投与した群について比較して、脾臓の混合リンパ球培養反

応の加齢による低下を免疫乳を投与した群がどの程度抑制したかを検討した。その結果を表4に示す。

【0036】

【表4】

指 標	乳	A - B = C	t 検 定
C3H	免 疫 乳	4.4 ± 3.6] P < 0.1
	コントロール乳	7.2 ± 2.6	
BALB/C	免 疫 乳	6.2 ± 4.3] P < 0.05
	コントロール乳	10.2 ± 2.8	

【0037】この結果を検討したところ、加齢に伴って低下した脾臓の混合リンパ球培養反応の低下の度合が、免疫乳を使用した群は、コントロール乳を使用した群と比較して顕著に抑制していることが確認された。

【0038】上記混合リンパ球反応は、村松 繁共著

「実験生理学講座」第14巻免疫生物学1985年、第383～385頁に基づいて行った。

【0039】相対的刺激指数は次の数式Iで示される。

【0040】

【数1】

$$\text{相対的刺激指数} = \frac{\text{エフェクター細胞に刺激細胞を加えたものの cpm}}{\text{エフェクター細胞のみの cpm}}$$

【0041】実験2：腸間膜のリンパ節の混合リンパ球培養反応

【0042】方法：8週齢のC57BL/6CrSLC雌マウス14匹を2群に分け、その各群（7匹）に免疫乳又はコントロール乳の粉末48.9gを混合飼料11.1gに混入して、1日あたり3g/匹を継続的に69～71週間摂取させ、その後で屠殺し、腹部を開いて取り出した腸間膜リンパ節を10ccのRPMI 1640の培地を加えたシャーレに入れる。シャーレ内で2枚のスライドガラスで押しつぶす。遊離した細胞をガーゼで濾して、回収し、腸間膜リンパ節のリンパ球を得た。

【0043】他方、同種異系であるC3HあるいはBALB/Cマウスを屠殺し、摘出した脾臓に25Gyの放射線量を照射した後に得られた脾臓細胞を刺激細胞として使用した。前記加齢マウスの腸間膜リンパ節に含まれるリンパ球を使用し、その各々5×10⁵/ウェル

に、C3HあるいはBALB/Cマウスの脾臓細胞5×10⁵/ウェルを加え、CO₂インキュベーターにて37℃で3日間培養した。培養終了4時間前に、1μCi/ウェルの³Hチミジンを添加し、培養終了後、フィルター上に回収された細胞に取り込まれたトリチウムでラベルしたチミジン量をβカウンタにて測定し、加齢マウスの腸間膜リンパ節の混合リンパ球培養反応の相対的刺激指数を算出した。

【0044】そして、前記加齢マウスとは異った個体の7～9週齢の若齢マウスにおける混合リンパ球培養反応を前記と同様の方法で測定し、相対的刺激指数を算出し、若齢マウスの相対的刺激指数を基準として、免疫乳又はコントロール乳を与えた加齢マウスの相対的刺激指数の変動を比較した。その結果を表5に示す。

【0045】

【表5】

週 齢	指 標	乳	相 対 的 刺 激 指 数 ± S. D.
7-9 (若 齢) [C57BL/6 CrSLC 雌マウス]	C3H	-	19.96 ± 6.84
	BALB/C	-	24.76 ± 3.56
69-71 (老 齢) [C57BL/6 CrSLC 雌マウス]	C3H	免 疫 乳	9.92 ± 6.25
		コントロール乳	3.66 ± 3.43
	BALB/C	免 疫 乳	14.89 ± 8.64
		コントロール乳	4.86 ± 3.72

【0046】次に、C3H、BALB/Cを指標とした場合それぞれにつき、若齢マウスの相対的刺激指数の数値(D)から加齢マウスの相対的刺激指数の数値(E)を差引いた値(F)を、免疫乳又はコントロール乳を投与した群で比較し、腸間膜リンパ節の混合リンパ球培養

反応が加齢による低下を免疫乳を投与した群がどの程度抑制したかを検討した。その結果を表6に示す。

【0047】

【表6】

指 標	乳	D - E = F	t 検 定
C3H	免 疫 乳	10.0 ± 6.3	—
	コントロール乳	16.3 ± 3.4	
BALB/C	免 疫 乳	9.9 ± 8.6] P < 0.05
	コントロール乳	19.9 ± 3.7	

【0048】この結果から、加齢に伴って低下した腸間膜リンパ節の混合リンパ球反応の低下の度合は、免疫乳を投与した群の方が、コントロール乳を投与した群と比較して顕著に抑制していることが確認された。

【0049】実験3：腸間膜リンパ節のマイトジェン応答性

【0050】方法：8週齢のC57BL/6CrSIC雌マウス14匹を2群に分け、その各群(7匹)に免疫乳又はコントロール乳の粉末を48.9gを混合飼料11.1gに混入して、1日あたり3g/匹を継続的に69～71週間摂取させた後に、屠殺し、腹部を開いて取り出した腸間膜リンパ節を10ccのRPMI 1640培地を加えたシャーレに入れる。シャーレ内で2枚のスライドグラスで押しつぶす。遊離した細胞をガーゼで濾して、回収し腸間膜リンパ節内のリンパ球を得た。前記加齢マウスの腸間膜リンパ節に含まれるリンパ球を使用し、その各々5×10⁵/ウェルに。コンカナバリン

A (ConA) 0.4μg/ウェル、ファイトヘムアグルチニン(PHA) 0.02%(V/V)/ウェルあるいはリボ多糖10μg/ウェルを加え、CO₂インキュベータにて37℃、3日間培養した。培養終了後、フィルター上に回収された細胞に取り込まれたトリチウムでラベルしたチミジン量をβ-カウンターにて測定し、加齢マウスの腸間膜リンパ節のマイトジェン応答性の相対的刺激指数を算出した。

【0051】そして、前記加齢マウスとは異った個体の若齢マウスにおける腸間膜リンパ節のマイトジェン応答性を前記と同様の方法で測定し、相対的刺激指数を算出し、若齢マウスの相対的刺激指数を基準として、免疫乳又はコントロール乳を与えた加齢マウスの相対的刺激指数の変動を比較した。その結果を表7に示す。

【0052】

【表7】

週 齢	指 標	乳	相 対 的 刺 激 指 数 ± S. D.
7-9 (若 齢) [C57BL/6 CrSLC 雌マウス]	ConA	-	23.8 ± 15.2
	PHA	-	14.4 ± 7.3
	LPS	-	12.4 ± 5.4
69-71 (老 齢) [C57BL/6 CrSLC 雌マウス]	ConA	免 疫 乳	13.5 ± 5.1
		コントロール乳	10.2 ± 7.5
	PHA	免 疫 乳	16.4 ± 4.4
		コントロール乳	2.8 ± 2.1
	LPS	免 疫 乳	13.8 ± 3.1
		コントロール乳	3.1 ± 2.4

【0053】次に、ConA、PHA又はLPSを指標とした場合、それぞれにつき若齢マウスの相対的刺激指数の値 (G) から加齢マウスの相対的刺激指数の値

(H) を差引いた値 (I) を免疫乳又はコントロール乳を投与した群で比較することにより、腸間膜リンパ節の

マイトジェン応答性の加齢による低下を、免疫乳を投与した群がどの程度抑制したかを検討した。その結果を表8に示す。

【0054】

【表8】

指 標	乳	G - H = I	t 検 定
ConA	免 疫 乳	10.3 ± 5.1	-
	コントロール乳	13.6 ± 7.5	
PHA	免 疫 乳	- 2.0 ± 4.4] P < 0.05
	コントロール乳	11.6 ± 2.1	
LPS	免 疫 乳	- 1.4 ± 3.1] P < 0.05
	コントロール乳	9.3 ± 2.4	

【0055】尚、ConA (コンカナバリンA) 及びPHA (ファイトヘムアグルチニン) は、植物由来のレクチン類であり、T細胞を刺激し活性化し、DNA合成と細胞増殖を引き起こすマイトジェンの一種である。

【0056】腸間膜リンパ節のリンパ球には、T細胞の他にB細胞も含まれるので、B細胞の免疫応答能力の指標としてLPS (リボ多糖) に対する反応も測定した。

【0057】免疫乳を投与した群は、加齢に伴って低下した腸間膜リンパ節のマイトジェン反応の低下の度合を、免疫乳を投与した群と、コントロール乳を投与した群と比較すると、免疫乳を投与した群の方が顕著に抑制

していることが確認された。

【0058】

【効果】免疫機能は、感染防御と生体内の免疫監視機構としての役割とを担っており、加齢により免疫機能の低下が起こると疾病の発生の誘因となる。

【0059】本発明に係る加齢に伴う免疫低下を抑制する組成物は、加齢とともに発症し易くなると言われる肺炎等の呼吸器感染症、带状疱疹等の皮膚疾患、尿路感染症、胆道感染症など、いわゆる老齢病とよばれる疾患の発症や老人が外科手術をうけた場合の術後の合併症、傷の化膿や風邪の発症を予防または治療する効果がある。

【0060】また、本発明の組成物は、経口投与ができ、しかも安全性が高いので、毎日手軽に摂取すること

ができる実用性に優れたものである。

フロントページの続き

(72)発明者 石田 篤識
埼玉県本庄市南 2-6-5

(72)発明者 室崎 伸二
福岡県福岡市西区姪浜 1-24-27-102